

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 744 731**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **96 01603**

⑤1 Int. C⁶ : C 12 N 15/38, C 12 N 15/52, 15/85, 15/86, C 07 K
14/035, A 61 K 48/00, 38/43

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 09.02.96.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 14.08.97 Bulletin 97/33.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE POULENC RORER SA
SOCIETE ANONYME — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BLANCHE FRANCIS, CAMERON
BEATRICE, COUDER MICHEL et CROUZET JOEL.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire :

⑤4 NOUVEAUX VARIANTS DE LA THYMIDINE KINASE, SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES
CORRESPONDANTES ET LEUR UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE.

⑤7 La présente invention se rapporte à une séquence
d'acides nucléiques caractérisée en ce qu'elle dérive de la
séquence d'acides nucléiques sauvage codant pour une
thymidine kinase, ladite séquence d'acides nucléiques pos-
sédant au moins une mutation dans la région correspon-
dant au site de liaison à l'ATP.

Elle concerne en outre des variants de la thymidine ki-
nase sauvage et leurs utilisations en thérapie génique.

FR 2 744 731 - A1



La présente invention concerne des séquences d'acides nucléiques codant pour des enzymes dérivées de l'enzyme thymidine kinase sauvage, TK, et possédant des fonctions améliorées en vue d'une utilisation thérapeutique. Elle concerne plus particulièrement des nouvelles enzymes possédant une spécificité et/ou une efficacité améliorées par rapport à l'enzyme thymidine kinase de type sauvage. Elle se rapporte également à des vecteurs contenant ces séquences d'acides nucléiques et à leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique.

La présente invention concerne plus particulièrement le domaine de la thérapie génique qui met en oeuvre des gènes suicides en vue d'induire la mort cellulaire de cellules spécifiques telles que des cellules infectées par un virus comme le virus de type VIH (virus d'immunodéficience humaine), CMV (cytomegalovirus) ou VCR (virus respiratoire syncytial). Ce type de traitement thérapeutique, consistant à faire exprimer au sein d'une cellule un gène suicide, est également appliqué pour le traitement des cancers et de certaines maladies cardiovasculaires.

Comme gène suicide, on utilise préférentiellement en thérapie génique des gènes dont le produit d'expression confère à la cellule, une sensibilité à un agent thérapeutique. Plus généralement, il s'agit de gènes codant pour des enzymes non mammifères et non toxiques qui, lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules de mammifères, transforment une prodrogue, initialement peu ou pas toxique, en un agent hautement toxique. Un tel mécanisme d'activation de prodrogues est avantageux à plusieurs titres: il permet d'optimiser l'indice thérapeutique en ajustant la concentration en prodrogue ou l'expression de l'enzyme, d'interrompre la toxicité en n'administrant plus la prodrogue et d'évaluer le taux de mortalité.

De nombreux gènes suicides sont décrits dans la littérature comme par exemple les gènes codant pour la cytosine désaminase, la purine nucléoside phosphorylase ou une thymidine kinase comme par exemple les thymidines kinases du virus de la varicelle ou du virus de l'herpès simplex de type 1. Parmi ces gènes, le gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 est tout particulièrement intéressant sur le plan thérapeutique car, à la différence des autres gènes suicides, il génère une enzyme, la thymidine kinase, capable d'éliminer spécifiquement les cellules en cours de division. Cette enzyme a une spécificité de substrat différente de l'enzyme cellulaire, et a été montrée être

la cible d'analogues de guanosine tels que l'acyclovir ou le ganciclovir (Moolten 1986 Cancer Res. 46 p5276).

5 Dans le cas particulier du couple HSV1-TK / ganciclovir, le mécanisme d'action peut être schématisé comme suit: les cellules de mammifères, modifiées pour exprimer l'enzyme HSV1-TK, effectuent la première étape de phosphorylation du ganciclovir pour conduire au ganciclovir monophosphate. Cette étape serait limitante. Ultérieurement, des kinases cellulaires permettent la métabolisation de ce ganciclovir monophosphate successivement en diphosphate puis triphosphate. Le ganciclovir triphosphate ainsi généré, 10 produit alors des effets toxiques en s'incorporant à l'ADN et inhibe en partie l'ADN polymérase alpha cellulaire ce qui provoque l'arrêt de la synthèse d'ADN et donc conduit à la mort de la cellule (Moolten 1986 Cancer Res. 46 p5276 ; Mullen 1994 Pharmac. Ther. 63 p199).

15 Par ailleurs, un effet de toxicité propagée (effet "by stander") a été observé lors de l'utilisation de la TK. Cet effet se manifeste par la destruction non seulement des cellules ayant incorporé le gène TK mais également les cellules avoisinantes. Le mécanisme de ce processus peut s'expliquer de trois façons : i) la formation de vésicules apoptotiques qui contiennent du ganciclovir phosphorylé ou la thymidine kinase, provenant des cellules 20 mortes, puis la phagocytose de ces vésicules par les cellules voisines; ii) le passage de prodrogue métabolisée par la thymidine kinase, par un processus de coopération métabolique des cellules contenant le gène suicide vers les cellules ne le contenant pas et/ou iii) une réponse immunitaire liée à la régression de la tumeur (Marini et coll. 1995 Gene Therapy 2 p655).

25 Pour l'homme de l'art, l'utilisation du gène suicide codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès est très largement documentée. En particulier, les premières études in vivo sur des rats ayant un gliome montrent des régressions de tumeurs lorsque le gène HSV1-TK est exprimé et que des doses de 150 mg/kg de ganciclovir sont injectées [K. Culver et coll. 1992 Science 256 p1550]. Toutefois, ces doses sont hautement toxiques 30 chez la souris [T. Osaki et coll. 1994 Cancer Research 54 p5258] et donc totalement proscrites en thérapie génique chez l'homme.

Un certain nombre d'essais thérapeutiques sont également en cours chez l'homme, dans lesquels le gène TK est délivré aux cellules au moyen de différents vecteurs tels que 35 notamment des vecteurs rétroviraux ou adénoviraux. Dans les essais cliniques de thérapie

génique chez l'homme, ce sont des doses beaucoup plus faibles qui doivent être administrées de l'ordre de 5 mg/kg et pour une durée du traitement courte (14 jours) (E. Oldfield et coll. 1995 Human Gene Therapy 6 p55). Pour des doses plus élevées ou des traitements plus prolongés dans le temps, on observe en effet des effets secondaires indésirables.

Il serait donc particulièrement avantageux de disposer d'un gène suicide apparenté au gène codant pour la thymidine kinase sauvage, capable de générer un variant de l'enzyme TK sauvage plus spécifique et/ou plus actif pour phosphoryler le ganciclovir; Anvatageusement, un tel variant peut également être mis en oeuvre à une dose significativement réduite comparativement à la dose en gène suicide sauvage, et en outre permettre de réduire la dose de substrat qui lui est classiquement associée.

La présente invention a précisément pour objet de proposer une séquence d'acides nucléiques codant pour une enzyme de type thymidine kinase ayant un comportement activateur plus performant à l'égard du ganciclovir ou un analogue nucléoside.

La séquence du gène codant pour l'enzyme thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 a été décrite dans la littérature (voir notamment McKnight 1980 Nucl. Acids Res. 8 p5931). Il en existe des variants naturels conduisant à des protéines ayant une activité enzymatique comparable sur la thymidine, ou le ganciclovir (M. Michael et coll. 1995 Biochem. Biophys. Res. Commun 209 p966). De même, ont été décrits des dérivés obtenus par mutagenèse dirigée au niveau du site de liaison de l'enzyme avec le substrat. Toutefois, aucune caractérisation biochimique précise sur les enzymes pures n'a été réalisée et aucun test cellulaire utilisant ces mutants n'a été publié (Black et coll., 1993 Biochemistry 32 p11618). En outre, l'expression inductible d'un gène HSV1-TK, délété de ses 45 premiers codons, a été réalisée dans des cellules eucaryotes mais les doses en prodrogue utilisées demeurent comparables à celles décrites dans tous les essais de la littérature (B. Salomon et coll. 1995 Mol. Cell. Biol. 15 p5322). En conséquence, aucun des variants décrits jusqu'ici ne présente une activité améliorée à l'égard ou vis à vis du ganciclovir.

La présente invention décrit la construction de nouveaux variants de thymidine kinase possédant des propriétés enzymatiques améliorées. La présente demande décrit également la construction de séquences d'acides nucléiques codant pour ces variants ainsi

que des vecteurs contenant lesdites séquences et permettant leur administration in vivo et la production in vivo des mutants.

De manière inattendue, la Demanderesse a en effet préparé, isolé et caractérisé une série de séquences d'acides nucléiques particulières codant pour des variants de la thymidine kinase possédant le comportement activateur requis c'est à dire significativement améliorée comparativement à celui de la thymidine kinase sauvage. La demanderesse a en particulier mis en évidence que de nouveaux variants de la thymidine kinase ayant des propriétés enzymatiques améliorées pouvaient être obtenus notamment par modification de la région de la protéine responsable de la liaison avec l'ATP.

Ainsi un premier objet de l'invention réside dans une séquence d'acides nucléiques codant pour une thymidine kinase caractérisée en ce qu'elle possède au moins une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP.

Plus précisément, la présente invention a pour premier objet une séquence d'acides nucléiques caractérisée en ce qu'elle dérive de la séquence d'acides nucléiques codant pour une thymidine kinase sauvage, ladite séquence d'acides nucléiques possédant au moins une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP.

Au sens de la présente invention, le terme mutation, couvre toute substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus de la séquence d'acides nucléiques considérée. Il est entendu que la séquence d'acides nucléiques revendiquée peut comprendre d'autres mutations, localisées ou non, dans la région telle que définie ci-dessus.

Selon un mode préféré de l'invention, la séquence d'acides nucléiques dérive de la séquence codant pour la TK du virus herpès simplex de type I et préférentiellement la mutation y est représentée par au moins une substitution d'une guanine en position 180 par une adénine (G180A).

La séquence d'acides nucléiques codant pour un variant de la thymidine kinase est avantageusement choisie parmi :

(a) la séquence SEQ ID n° 3 ou une partie de celle ci portant la mutation (G180A) ou un de leur brin complémentaire.

(b) toute séquence hybridant avec les séquences (a) et codant pour un variant de la thymidine kinase

(c) les variants de (a) et (b) résultant de la dégénérescence du code génétique.

5 La séquence d'acides nucléiques selon l'invention peut être d'origine humaine, animale, virale, synthétique ou semi-synthétique.

D'une manière générale, les séquences d'acides nucléiques de l'invention peuvent être préparées selon toute technique connue de l'homme du métier. A titre illustratif de ces techniques on peut notamment mentionner:

- 10 - la synthèse chimique, en utilisant les séquences présentées dans la demande et par exemple un synthétiseur d'acides nucléiques,
- le criblage de banques au moyen de sondes spécifiques, notamment telles que décrites dans la demande, ou encore
15 - les techniques mixtes incluant la modification chimique (élongation, délétion, substitution, etc) de séquences criblées à partir de banques.

Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent également être obtenues par mutagenèse(s), dirigée(s) ou non, d'une séquence d'acides nucléiques, naturelle ou déjà mutée, codant respectivement pour une thymidine kinase sauvage ou un de ses variants. De nombreuses méthodes permettant de réaliser la mutagenèse dirigée ou au hasard sont connues de l'homme de l'art et on peut citer la mutagenèse dirigée par PCR ou par oligonucléotide, la mutagenèse au hasard in vitro par des agents chimiques comme par exemple l'hydroylamine ou in vivo dans des souches de E. coli mutatrices (Miller "A short course in bacterial genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1992).

20 La présente invention s'étend ainsi à toute séquence d'acides nucléiques codant pour un variant d'une thymidine kinase sauvage et susceptible d'être obtenue à partir d'une séquence d'acides nucléiques telle que revendiquée en mettant en oeuvre l'une des techniques de modifications précédemment citées et plus préférentiellement la mutagenèse, dirigée ou non.

Avantageusement, les produits des séquences revendiquées selon la présente invention s'avèrent plus performants que l'enzyme naturelle dont ils dérivent par modification(s) structurale(s). Exprimés dans des cellules cibles, ils présentent une activité

enzymatique améliorée par rapport à l'enzyme naturelle vis à vis du ganciclovir ou un analogue de nucléoside. Le comportement dit "plus activateur" ou "l'activité enzymatique améliorée" des variants selon l'invention s'apprécie comparativement à celui de l'enzyme sauvage, selon les protocoles décrits en détails dans les exemples ci-après.

5

Au sens de la présente invention on entend couvrir par analogue nucléoside des composés de type acyclovir, trifluorothymidine, 1-[2-deoxy, 2-fluoro, beta-D-arabino furanosyl]-5-iodouracil, ara-A, araT, 1-beta-D-arabinofuranosyl thymidine, 5-éthyl-2'-
10 déoxyuridine, iodouridine, AZT, AIU, didéoxycytidine et AraC. A titre d'analogue préféré dans le cadre de la présente invention, on peut plus particulièrement citer les BVDU, ganciclovir et penciclovir.

La présente invention a également pour objet des variants de thymidine kinase
15 sauvages susceptibles d'être exprimés à partir d'une séquence d'acides nucléiques revendiquée.

Avantageusement, les variants selon l'invention présentent des performances améliorées au niveau de l'une ou plusieurs des caractéristiques enzymatiques suivantes:

20 - inhibition par le substrat: une inhibition par le ganciclovir à forte concentration est généralement observée avec l'enzyme sauvage; celle-ci est diminuée voire supprimée avec les variants selon l'invention.

-Vitesse de phosphorylation du ganciclovir ou d'un autre analogue de nucléoside: les variants selon l'invention possèdent avantageusement une plus grande vitesse de
25 phosphorylation du ganciclovir ou d'un autre analogue;

- Vitesse de phosphorylation de la thymidine: celle ci est préférentiellement inchangée ou diminuée avec les variants de l'invention ce qui leur confère une plus grande sélectivité vis à vis du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside.

30 Plus particulièrement, l'invention s'étend à tout variant d'une thymidine kinase caractérisé en ce qu'il comprend au moins une mutation au niveau de son site de fixation à l'ATP.

La localisation de ce site de fixation de l'ATP, au sein de la séquence peptidique de
35 la thymidine kinase varie selon l'origine virale de celle-ci. C'est ainsi que, selon que l'on

considère la thymidine kinase du virus de la varicelle, du virus de l'herpès simplex, de type I ou non, cette région est positionnée en des régions différentes. Toutefois, de manière générale, elle y figure sous le motif peptidique suivant GXXXXGK(T/S) (SEQ ID N°1) avec X représentant un acide aminé quelconque et dans le cas particulier de la thymidine kinase de l'Herpès simplex virus de type I, sous la séquence spécifique suivante GPHGMGKT (SEQ ID N°2).

En conséquence, la présente invention vise tout variant d'une thymidine kinase sauvage comprenant au niveau de sa région peptidique suivante GXXXXGK(T/S) au moins une mutation.

Selon un mode préféré de la présente invention, la séquence possédant au moins une mutation est celle représentée par GPHGMGKT (SEQ ID N°2). Dans ce cas particulier, la mutation y est plus préférentiellement représentée par au moins une substitution en position 60 d'une Méthionine par une Isoleucine.

A titre représentatif de ce type de mutant, on peut plus particulièrement citer le mutant 1537:E4 décrit dans les exemples ci-après.

Préférentiellement, les variants selon l'invention présente au moins l'une des performances cinétiques suivantes:

- une diminution de l'inhibition de la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside à des concentrations élevées en ganciclovir ou en analogue de nucléoside,
- une vitesse de phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside au moins doublée et/ou
- une vitesse de phosphorylation de la thymidine réduite d'un facteur de 1,5 au moins.

Plus préférentiellement les variants selon l'invention et en particulier le variant 1537:E4 manifestent avantageusement les propriétés cinétiques suivantes:

- une absence presque totale d'inhibition de l'activité de phosphorylation du ganciclovir contrairement à l'enzyme sauvage pour laquelle l'inhibition est très nette à partir de 15µM;
- une augmentation d'un facteur de 2 à 2,5 de la vitesse initiale de phosphorylation du GCV à partir de 15-20µM par rapport à l'enzyme sauvage et
- une vitesse initiale maximale (Vmax) de la phosphorylation de la thymidine réduite d'un facteur 1,5 par rapport à l'enzyme sauvage.

Plus généralement, l'objet de la présente invention s'étend à des variants de la thymidine kinase possédant les caractéristiques suivantes

- une réduction de l'inhibition de la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside à concentration élevée,
- 5 - une vitesse de phosphorylation du ganciclovir augmentée d'un facteur de 2 au moins;
- une vitesse de phosphorylation de la thymidine réduite d'un facteur de 1,5 au moins.

De telles qualités sont particulièrement avantageuses sur le plan thérapeutique puisqu'elles permettent d'envisager une réduction significative des doses d'utilisation en
10 enzymes et/ou en analogue de nucléoside pour une efficacité au moins équivalente voire supérieure. L'innocuité est privilégiée sans pour autant porter préjudice à l'efficacité.

Au sens de l'invention, on entend également désigner par variant selon la présente invention toute enzyme obtenue par modification, à l'aide des techniques du génie
15 génétique, de la séquence d'acides nucléiques codant pour une thymidine kinase sauvage et possédant le comportement défini ci-dessus au regard du ganciclovir et/ou un analogue nucléoside. (Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification de nature génétique et/ou chimique).

Bien entendu, ces dérivés selon l'invention, capables d'induire via l'activation du
20 ganciclovir ou un de ses analogues, la destruction desdites cellules peuvent avantageusement être exprimés in vivo directement à partir des séquences d'acides nucléiques revendiquées.

A cet effet, la présente invention concerne également toute cassette d'expression comprenant une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant, un promoteur
25 permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription. Le promoteur est avantageusement choisi parmi les promoteurs fonctionnels dans les cellules mammifères, de préférence humaines. Plus préférentiellement, il s'agit d'un promoteur permettant l'expression d'une séquence d'acides nucléiques dans une cellule hyperproliférative (cancéreuse, resténose, etc). A cet égard, différents promoteurs peuvent être utilisés. Il
30 peut s'agir par exemple du propre promoteur du gène TK de l'herpès simplex de type I. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres gènes, ou même synthétiques). Il peut ainsi s'agir de tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. On peut citer notamment les séquences promotrices de

gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, alpha-actine, tubuline, DHFR etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoA1, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras, alpha-actine du muscle lisse, etc), des promoteurs cellules spécifiques de type cellules en division comme les cellules cancéreuses ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinolique, récepteur de glucocorticoïdes, etc) ou dits inductibles. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

La présente invention fournit maintenant de nouveaux agents thérapeutiques permettant d'interférer avec de nombreux dysfonctionnements cellulaires. Dans ce but, les acides nucléiques ou cassettes selon l'invention peuvent être injecté(e)s tel(le)s quel(le)s au niveau du site à traiter, ou incubé(e)s directement avec les cellules à détruire ou traiter. Il a en effet été décrit que les séquences d'acides nucléiques nu(e)s pouvaient pénétrer dans les cellules sans vecteur particulier. Néanmoins, on préfère dans le cadre de la présente invention utiliser un vecteur d'administration, permettant d'améliorer (i) l'efficacité de la pénétration cellulaire, (ii) le ciblage (iii) la stabilité extra- et intracellulaires.

Dans un mode de mise en oeuvre particulièrement préféré de la présente invention, la séquence d'acides nucléiques ou la cassette est incorporée dans un vecteur. Le vecteur utilisé peut être d'origine chimique, biochimique ou virale.

30

Par vecteur chimique, on entend couvrir au sens de l'invention, tout agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression de séquences d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes. Ces vecteurs chimiques ou biochimiques, synthétiques ou naturels, représentent une alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui

35

concerne la taille de l'ADN à transfecter. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transfecter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques. A titre représentatif de ce type de techniques de transfection non virales, actuellement développées pour l'introduction d'une information génétique, on peut ainsi mentionner celles impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraleigh et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

La séquence d'acides nucléiques ou le vecteur utilisé dans la présente invention peut être formulé en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, la séquence d'acides nucléiques ou le vecteur est utilisé sous une forme injectable. Il peut donc être mélangé à tout véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau du site à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Une injection directe de la séquence d'acides nucléiques dans la tumeur du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses en séquences d'acides nucléiques utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée.

L'invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant.

Elle concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur tel que défini ci-avant.

Elle concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant au moins un variant de la thymidine kinase tel que défini ci-avant.

5

En raison de leurs propriétés antiprolifératives, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont tout particulièrement adaptées pour le traitement des désordres hyperprolifératifs, tels que notamment les cancers et la resténose. La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement efficace pour la destruction de cellules, 10 notamment de cellules hyperprolifératives. Elle est ainsi applicable à la destruction des cellules tumorales ou des cellules de muscle lisse de la paroi vasculaire (resténose). Elle est tout particulièrement appropriée au traitement des cancers. A titre d'exemple, on peut citer les adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du poumon, les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, 15 les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers des os, de la peau, du pancréas ou encore les cancers du rein et de la prostate, les cancers de l'oesophage, les cancers du larynx, les cancers tête et cou, les cancers ano-génitaux HPV positifs, les cancers du nasopharynx EBV positifs, etc.

20

Elle peut être utilisée in vitro ou ex vivo. Ex vivo, elle consiste essentiellement à incuber les cellules en présence d'une séquence d'acides nucléiques (ou d'un vecteur, ou cassette ou directement du dérivé). In vivo, elle consiste à administrer à l'organisme une quantité active d'un vecteur (ou d'une cassette) selon l'invention, de préférence directement 25 au niveau du site à traiter (tumeur notamment), préalablement, simultanément et/ou après l'injection de la prodrogue considérée c'est à dire le ganciclovir ou un analogue nucléoside. A cet égard, l'invention a également pour objet une méthode de destruction de cellules hyperprolifératives comprenant la mise en contact desdites cellules ou d'une partie d'entre-elles avec une séquence d'acides nucléiques ou un variant de la thymidine kinase 30 tels que définis ci-avant.

En conséquence, la présente invention propose une enzyme TK mutée de telle sorte que la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue nucléoside mis en oeuvre, soit très significativement augmentée. Avantagement, on peut ainsi, selon l'invention, 35 utiliser dans des tests cellulaires et cliniques un séquence d'acides nucléiques TK mutée à

des doses de prodrogue i) significativement plus faibles ; ii) ou susceptibles de provoquer un effet "by-stander" plus prononcé , iii) ou bien ne conduisant pas à une toxicité cellulaire qui pourrait se produire lorsque la thymidine kinase sauvage est surexprimée.

- 5 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures:

Figure 1 : Plasmide d'expression pXL2645

- 10 Figure 2 : Vitesses initiales de phosphorylation en fonction de la concentration de ganciclovir pour les enzymes HSV1-TK sauvage et mutante I537:E4

MATERIELS ET METHODES

Abréviations

- 15 ACV : acyclovir
GCV : ganciclovir
HSV1-TK : thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type I.

Techniques générales de biologie moléculaire

- 20 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la
25 transformation dans Escherichia coli sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature (Sambrook et coll. "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel et coll. "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987).
- 30 Les plasmides de type pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories), les plasmides pBSK ou pBKS proviennent de Stratagen.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymerase-catalyzed Chain Reaction] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les recommandations du fabricant.

L'électroporation d'ADN plasmidique dans des cellules de *E. coli* peut-être réalisée à l'aide d'un électroporateur (Bio-Rad) selon les recommandations du fournisseur.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham ou celui distribué par Applied Biosystems.

10

EXEMPLE 1 : CRIBLAGE BIOCHIMIQUE DE MUTANTS HSV1-TK.

1-1 Plasmide d'expression procaryote du gène HSV1-TK.

15

Plusieurs systèmes d'expression du gène HSV1-TK chez *E. coli* sont décrits dans la littérature (Colbère et coll. 1979 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 p3755 ; Kit et coll. 1981 Gene 16 p287 ; Waldman et coll. 1983 J. Biol. Chem. 258 p11571 ; Fetzer et coll. 1992 Pharm. Pharmacol. Lett. 2 p112 ; Brown et coll. 1995 Nature Structural Biology 2 p876). Celui qui est décrit ci-dessous permet une production très régulée et élevée de la protéine HSV1-TK sous sa forme native (non fusionnée, non tronquée).

20

Le plasmide d'expression procaryote pXL2638 a été construit à partir du plasmide pHSV-106 (Gibco-BRL) et du vecteur d'expression pET11a (provenant de Novagen) de la façon suivante. Après avoir rendu les extrémités franches, l'insert BglII-NcoI de 1,5 kb provenant de pHSV-106 et contenant le gène HSV1-TK, dont la séquence est publiée par McKnight 1980 Nucl. Acids Res. 8 p5931, a été cloné au site SmaI du pBSK pour former le plasmide pBTK1. Un site NdeI a été introduit par mutagenèse dirigée à partir de la position -3 de la séquence codante du gène HSV1-TK. Pour cela un fragment de 500 bp contenant la partie 5' du gène a été amplifié par PCR en utilisant pBTK1 comme matrice et les oligonucléotides sens 5'(TTA TGA ATT CAT ATG GCT TCG TAC CCC GGC)3' SEQ ID N°4 et antisens 5'(TTA TTT CTA GAG GTC GAA GAT GAG GGT)3' SEQ ID N°5 comme amorces ; ce fragment a été cloné dans M13mp19 puis séquencé. Ce fragment digéré par EcoRI et SstI génère un insert de 460 pb qui a été co-cloné avec l'insert SstI-XbaI de 1 kb du pBTK1 contenant la partie 3' du gène HSV1-TK dans le plasmide pUC19 digéré par EcoRI et XbaI ; ce plasmide pUCTK contient le gène HSV1-TK sous forme de

25

30

35

cassette NdeI-BamHI qui a été clonée entre les sites NdeI et BamHI du pET11a pour créer le plasmide pXL2638. Ce plasmide permet d'exprimer le gène HSV1-TK sous le contrôle du promoteur du gène 10 du bactériophage T7 : ce promoteur étant induit lorsque l'ARN polymérase du bactériophage T7 est synthétisée comme par exemple dans la souche de E. coli BL21, lambdaDE3 (Studier et coll. 1990 Methods Enzymol. **185** p89).

1-2 Préparation des extraits acellulaires.

10 Les extraits acellulaires de souche de E. coli surproduisant la protéine HSV1-TK peuvent être préparés de diverses façons, parmi lesquelles on peut citer, la lyse au lysozyme en présence d'EDTA, l'utilisation d'appareils de broyage de type Menton-Golin, French Press, X-Press, ou l'action des ultrasons. Plus particulièrement, les extraits acellulaires de la souche de E. coli BL21, lambdaDE3 (Novagen Inc) pXL2638 ont été préparés de la
15 façon suivante:

La souche E. coli BL21, lambdaDE3 pXL2638 est cultivée en milieu LB (Luria-Bertani) + ampicilline (50 mg/l) à 37 °C jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,7 ; la production de la protéine HSV1-TK est induite par l'ajout de 1 mM IPTG (isopropylthio-beta-D-galactoside) et s'effectue en poursuivant la croissance des cellules pendant 3 heures à 30
20 °C. Après centrifugation (5000 x g; 20 min), les cellules obtenues à partir de 1 l de culture sont resuspendues dans 10 ml de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8, contenant 5 mM DTT, 4 mM MgCl₂, et 10 % glycérol (v/v), et soniquées durant 4 min à 4°C. Après centrifugation (50 000 x g; 1 h), le surnageant est injecté sur une colonne de Source 15Q (50 ml de gel; Pharmacia) équilibrée dans le tampon ci-dessus. Les protéines sont éluées
25 avec un gradient linéaire de 0 à 400 mM NaCl dans le tampon A. Les fractions contenant l'activité TK sont regroupées, amenées à une concentration finale de 1,1 M de sulfate d'ammonium et chromatographiées sur une colonne de Phenyl-Superose HR 10/10 (Pharmacia) éluee avec un gradient linéaire décroissant de 1,1 à 0 M de sulfate d'ammonium. Les fractions contenant l'activité TK sont regroupées. Après cette étape, la
30 préparation présente une seule bande visible en SDS-PAGE, après révélation au Bleu de Coomassie, et cette bande migre avec un poids moléculaire apparent de 41 000 environ.

1-3 Dosage de l'activité TK.

On peut détecter l'activité ATP-dépendante de phosphorylation de nucléosides en procédant par exemple de la façon suivante:

un extrait enzymatique contenant environ 0.1 unité de TK est incubé durant 15 min à 37°C dans 100 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 contenant 1 mg/ml BSA (albumine bovine sérique), 5 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 12 mM KCl, 2 mM DTT, 600 µM EDTA et 100 µM [8-3H]-GCV (40 nCi/nmol). La réaction est arrêtée par l'ajout de 10 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 contenant 1mM thymidine non radioactive. Les espèces phosphorylées sont fixées sur une colonne de DEAE-Sephadex (400 µl de gel), puis, après lavage de la colonne, ces espèces sont éluées par 2 ml de 1 M HCl. La radioactivité dans l'échantillon est ensuite comptée par scintillation liquide.

Le dosage de l'activité TK en utilisant la thymidine comme substrat est effectué de la même façon en mettant en jeu 0,002 unité de TK et 1 µM [6-3H]-thymidine (2 µCi/nmol). L'unité d'activité TK est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour phosphoryler 1 nmol de substrat par min dans les conditions ci-dessus.

Pour le calcul des constantes cinétiques, la quantité de TK introduite dans la réaction enzymatique est ajustée de façon à transformer au maximum 5 % du substrat introduit au départ, et l'activité spécifique de ce substrat est augmentée en conséquence. Les courbes de Michaelis sont ajustées aux points expérimentaux à l'aide du logiciel Enzfitter (Sigma).

20

1-4 Plasmide pXL2645 permettant un criblage biochimique.

Les systèmes d'expression hétérologue chez *E. coli* sont nombreux et bien connus de l'homme du métier. L'expression du gène HSV1-TK s'est avérée être la meilleure pour le criblage biochimique lorsque le gène est exprimé à l'aide du promoteur tryptophane pTryp à un nombre de copies élevé sur le plasmide pXL2645. L'insert NdeI-XbaI de 1,4 kb du pUCTK est co-cloné avec les inserts NdeI-EcoRI de 120 bp et EcoRI-XbaI de 3,1 kb du pXL694 (Jung et coll. 1988 Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 139 p129) pour générer le plasmide pXL2619. Les inserts suivant du pXL2619 : EcoRI-XbaI de 1,5 kb (contenant le gène HSV1-TK et pTryp : la région promoteur/opérateur de l'opéron tryptophane de *E. coli* suivie du RBS (site de fixation des ribosomes) du gène *cII* de lambda) et XbaI-BamHI de 530 bp contenant la région terminateur T_{rrnB} de l'opéron ribosomal de *E. coli* sont co-clonés dans le vecteur pBSK+ pour créer le plasmide pXL2645.

35

1-5 Mutagenèse du plasmide.

De nombreuses méthodes permettant de réaliser la mutagenèse dirigée ou au hasard sur plasmide sont connues de l'homme de l'art et on peut citer la mutagenèse dirigée par PCR
 5 ou par oligonucléotide en suivant les recommandations du fournisseur Amersham, la mutagenèse au hasard in vitro par des agents chimiques ou in vivo dans des souches de *E. coli* mutatrices (Miller "A short course in bacterial genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1992). Le plasmide pXL2645 a été mutagené à l'hydroxylamine selon un protocole déjà décrit et qui conduit à des transitions GC en AT
 10 au hasard sur le plasmide (Humphreys et coll. 1976 Mol. Gen. Genet. 145 p101). Cinq µg d'ADN plasmidique, dissous dans un tampon phosphate 0,2 M pH6 et contenant 0,4 M d'hydroxylamine, sont incubés à 80°C ou 86 °C pendant 30 min puis refroidis à température ambiante pendant 20 min, la solution est ensuite dialysée puis précipitée. L'ADN est alors redissous dans 50 µl d'eau. Si l'ADN plasmidique est pCH110
 15 (provenant de Pharmacia) et portant le gène *lacZ*) des mutants *lacZ*⁻ sont obtenus à une fréquence de 2,4% (resp. 7,6%) lorsque le plasmide est chauffé à 80°C (resp. 86°C) en présence d'hydroxylamine.

1-6 Criblage de mutants présentant une TK modifiée.

20 Le plasmide pXL2645 mutagené à l'hydroxylamine à 80 °C est introduit par électroporation dans la souche de *E. coli* *tk*⁻ ME8025 (provenant du National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka, Ken, Japon). Les électroporants sont ensemencés individuellement dans les puits de plaque de microtitration contenant 100 µl de milieu
 25 minimum M9 supplémenté avec 0,4 % de casaminoacides et 50 mg/l d'ampicilline. Les cultures sont incubées à 37 °C sous agitation pendant 17 heures. Quinze µl de la culture diluée au 1/25ième dans le tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 sont incubés pendant 20 min à 37°C dans un volume de 250 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 contenant 2 mg/ml lysozyme de blanc d'oeuf, 5 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 12 mM KCl, 2 mM DTT, 600 µM
 30 EDTA, 16 µM [8-3H]-GCV (60 nCi/nmol) et 1 µM [*methyl*-14C]-thymidine (56 nCi/nmol). La réaction est arrêtée par l'ajout de 25 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 contenant 1mM thymidine non radioactive. Les espèces phosphorylées sont fixées sur une colonne de DEAE-Sephadex (400 µl de gel), puis, après lavage de la colonne, ces espèces sont éluées par 2 ml de 1 M HCl. La radioactivité (3H et 14C) dans l'échantillon est

ensuite comptée par scintillation liquide en utilisant un programme de double marquage, et le ratio $3H/14C$ est calculé pour chaque échantillon.

Pour chaque plaque de microtitration de 96 puits, sont calculés la moyenne des ratios $3H/14C$ de l'ensemble des clones (M) et l'écart-type (σ) de la distribution des ratios

- 5 $3H/14C$. De plus la quantité de protéines présente dans chacun des puits de la plaque 96 puits est mesurée à l'aide du réactif de Bradford (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce) à partir d'une fraction aliquote de la dilution au 1/25^{ième} préparée ci-dessus. Tout clone présentant une teneur en protéines inférieure au quart de la moyenne des clones de la boîte est éliminé définitivement.

- 10 Le ratio $3H/14C$ obtenu pour chaque clone d'une boîte 96 puits est comparé à la moyenne M . Les clones présentant un ratio supérieur à la somme $M+3\sigma$ tout en présentant une activité de phosphorylation de la thymidine supérieure à $M/2$ sont retenus pour confirmation et étude.

- 15 Le tableau 1 résume les résultats obtenus après criblage de 4129 clones provenant de la mutagenèse à l'hydroxylamine du pXL2645 à 80°C. Dans ce criblage, pour l'enzyme sauvage, l'activité TK est rapportée à 100% et le rapport GCV/Thy est de 1.

A l'issue de cette étude, il est mis en évidence un mutant dit 1537:E4 manifestant un comportement plus activateur vis à vis du ganciclovir.

Activité TK	%<TK<%	Nombre	Mutants Noms	Fréquence
Elevée	233 <TK<320	2	3841:D2 3841:F3	0,05
Faible	5<TK<10	17		0,4
Nulle	TK<5	99		2,4
Nulle sur le GCV mais inchangée sur la thymidine		1	2881:C8	0,02
Elevée sur le GCV mais inchangée sur la thymidine	GCV/Thy : 1,76 (σ : 0,11) 1,70 (σ : 0,19)	2	1537:E4 1921H:12	0,05

TABLEAU 1

5

EXEMPLE 2 : STRUCTURE PRIMAIRE ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DU MUTANT 1537:E4.

10 **2-1 Séquence du gène HSV1-TK du mutant 1537:E4.**

Le gène HSV-TK exprimé à partir du mutant 1537:E4 a été séquencé sur les deux brins et une seule mutation G180A a été observée. Cette mutation correspond à une substitution Met60Ile. Il est à noter que ce résidu est situé dans la région consensus du site de fixation de l'ATP. Un travail comparable a été réalisé avec le mutant 1921:H12 et la même substitution (Met60Ile) a été observée.

20

2-2 Clonage du gène HSV1-TK du mutant 1537:E4 dans un vecteur procaryote d'expression élevée.

- 5 L'insert NdeI-BamHI de 1,4 kb codant pour le gène HSV1-TK du mutant 1537:E4 a été cloné dans le vecteur d'expression pET11a pour générer le pET:E4. C'est à partir de ce plasmide pET:E4 que l'enzyme HSV1-TK du mutant 1537:E4 a été produite chez E. coli BL21, lambdaDE3 dans les conditions décrites en 1-2.

2-3 Données biochimiques.

- 10 Les constantes cinétiques pour la TK mutante 1537:E4 et la TK sauvage prise en référence sont obtenues dans les conditions de dosage enzymatiques décrites au paragraphe 1-3. L'ensemble des valeurs obtenues est rapporté dans le tableau 2. La courbe de la figure 3
- 15 montre les vitesses initiales de phosphorylation en fonction de la concentration de GCV pour les deux enzymes 1537:E4 et sauvage. Elle fait apparaître en particulier l'absence presque totale d'inhibition de l'activité de phosphorylation du GCV par la TK mutante 1537:E4, contrairement à l'enzyme sauvage pour laquelle l'inhibition est très nette à partir de 15 μ M. Cette courbe montre de plus une augmentation d'un facteur 2 à 2,5 de la vitesse
- 20 initiale de phosphorylation du GCV à partir de 15-20 μ M avec l'enzyme mutante 1537:E4 par rapport à l'enzyme sauvage. Le tableau 2 montre d'autre part que l'enzyme mutante 1537:E4 présente une vitesse initiale maximale (V_{max}) de phosphorylation de la thymidine réduite d'un facteur 1,5 par rapport à l'enzyme sauvage.

Thymidine kinase	Thymidine		Ganciclovir		Acyclovir		ATP/Thymidine		ATP/Ganciclovir	
	<i>K_m</i> (μM)	<i>V_{max}</i>	<i>S₀</i> 5 (μM)	<i>V_{max}</i> obs*	<i>S₀</i> 5 (μM)	<i>V_{max}</i> obs*	<i>K_m</i> (μM)	<i>V_{max}</i>	<i>K_m</i> (μM)	<i>V_{max}</i>
Sauvage	0.21 ± 0.02	565 ± 42	4.13	553	51.4	217	6.6 ± 0.3	554 ± 7	15.6 ± 0.6	680 ± 9
Mutant 1537:E4	0.17 ± 0.02	370 ± 17	6.93	739	77.8	290	27.8 ± 4.3	327 ± 18	37.2 ± 2.6	790 ± 18

TABLEAU 2

* *V_{max}* observée.

Les 2 TK (sauvage et mutant 1537:E4) ne présentent pas un comportement Michaelien avec le Ganciclovir et l'Acyclovir (inhibition à forte concentration). Ceci interdit donc le calcul d'une valeur de *K_m* avec ces 2 substrats. Seule peut être donnée la concentration *S₀* 5 correspondant à concentration en substrat donnant une vitesse initiale égale à la moitié de la vitesse maximale observée.

V_{max} et *V_{max}* obs sont exprimées en nmole/min/mg de protéine.

EXEMPLE 3 - CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION DES VARIANTS DE TK

5

Cet exemple décrit la construction de vecteurs utilisables pour le transfert des séquences d'acides nucléiques de l'invention *in vitro* ou *in vivo*.

3.1 - Construction de vecteurs plasmidiques

10

Pour la construction de vecteurs plasmidiques, 2 types de vecteurs ont été utilisés.

- Le vecteur pSV2, décrit dans DNA Cloning, A practical approach Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. Ce vecteur est un vecteur d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les variants TK ont été insérés dans ce vecteur aux sites HpaI-EcoRV. Ils sont ainsi placés sous le contrôle du promoteur de l'enhancer du virus SV40.

15

- Le vecteur pCDNA3 (Invitrogen). Il s'agit également d'un vecteur d'expression eucaryote. Les séquences d'acides nucléiques codant pour les variants TK de l'invention sont ainsi placées, dans ce vecteur, sous le contrôle du promoteur précoce du CMV. Toutes les constructions décrites dans l'exemple 1 ont été introduites dans ce vecteur entre les sites Hind III / Not I pour être testées dans les différents systèmes d'évaluation *in vivo*.

20

3.2 - Construction de vecteurs viraux

Selon un mode particulier, l'invention réside dans la construction et l'utilisation de vecteurs viraux permettant le transfert et l'expression *in vivo* des acides nucléiques tels que définis ci-avant.

25

S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement

30

un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et un acide nucléique selon l'invention. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et la séquence d'acides nucléiques de l'invention (Cf FR94 13355). Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'acides nucléiques revendiquée. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de compléter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille
5 relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière
stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans
induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par
ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des
AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à
10 chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant
d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions
essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient
le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie
droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.
15 L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été
décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368,
US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées
des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène
d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo
20 (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs
selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire
infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide
contenant une séquence d'acides nucléiques de l'invention d'intérêt bordée de deux régions
répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes
25 rep et cap) d'AAV. Une lignée cellulaire utilisable est par exemple la lignée 293. Les AAV
recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants
a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et al., New
Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235;
30 McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus
intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs
d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement
deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans
les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont
35 généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide

nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants selon l'invention comportant une séquence d'acides nucléiques selon l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ladite séquence d'acides nucléiques est construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes suicides dans les cellules tumorales.

3.3 - Vecteurs chimiques

Parmi les vecteurs synthétiques développés, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention les polymères cationiques de type polylysine, (LK₂LK)_n, (LK₂KL)_n, polyéthylène imine et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines (lipofectamine, transfectam, etc) différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ainsi que des peptides d'origine nucléaire. En outre, le concept de la transfection ciblée a été développé, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un

- couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes a ainsi été décrit. La préparation d'une composition selon l'invention utilisant un tel vecteur chimique est réalisée selon toute technique connue de l'homme du métier, généralement
- 5 par simple mise en contact des différents composants.

LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.

(B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron

(C) VILLE: ANTONY

10 (E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 92165

(G) TELEPHONE: 40.91.69.22

(H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.96

15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: NOUVEAUX VARIANTS DE LA THYMIDINE
KINASE, SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CORRESPONDANTES ET LEUR
UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

20 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

25 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 8 acides aminés

(B) TYPE: acides aminés

35 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE:peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

40 GXXXXGK(TS)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 8 acides aminés

(B) TYPE: acides aminés

(D) CONFIGURATION: linéaire

50 (ii) TYPE DE MOLECULE:peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

55 GPHGMGKT

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 1131 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

15	ATG GCT TCG TAC CCC GGC CAT CAA CAC GCG TCT GCG TTC GAC CAG GCT	48
	Met Ala Ser Tyr Pro Gly His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala	
	1 5 10 15	
20	GCG CGT TCT CGC GGC CAT AGC AAC CGA CGT ACG GCG TTG CGC CCT CGC	96
	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg	
	20 25 30	
25	CGG CAG CAA GAA GCC ACG GAA GTC CGC CCG GAG CAG AAA ATG CCC ACG	144
	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr	
	35 40 45	
30	CTA CTG CGG GTT TAT ATA GAC GGT CCC CAC GGG ATG GGG AAA ACC ACC	192
	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr	
	50 55 60	
35	ACC ACG CAA CTG CTG GTG GCC CTG GGT TCG CGC GAC GAT ATC GTC TAC	240
	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr	
	65 70 75 80	
40	GTA CCC GAG CCG ATG ACT TAC TGG CGG GTG CTG GGG GCT TCC GAG ACA	288
	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr	
	85 90 95	
45	ATC GCG AAC ATC TAC ACC ACA CAA CAC CGC CTC GAC CAG GGT GAG ATA	336
	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile	
	100 105 110	
50	TCG GCC GGG GAC GCG GCG GTG GTA ATG ACA AGC GCC CAG ATA ACA ATG	384
	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met	
	115 120 125	
55	GGC ATG CCT TAT GCC GTG ACC GAC GCC GTT CTG GCT CCT CAT ATC GGG	432
	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly	
	130 135 140	
60	GGG GAG GCT GGG AGC TCA CAT GCC CCG CCC CCG GCC CTC ACC CTC ATC	480
	Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile	
	145 150 155 160	
65	TTC GAC CGC CAT CCC ATC GCC GCC CTC CTG TGC TAC CCG GCC GCG CGG	528
	Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg	
	165 170 175	
70	TAC CTT ATG GGC AGC ATG ACC CCC CAG GCC GTG CTG GCG TTC GTG GCC	576
	Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala	
	180 185 190	
75	CTC ATC CCG CCG ACC TTG CCC GGC ACC AAC ATC GTG CTT GGG GCC CTT	624
	Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu	

	195	200	205	
5	CCG GAG GAC AGA CAC ATC GAC CGC CTG GCC AAA CGC CAG CGC CCC GGC Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly 210 215 220			672
10	GAG CGG CTG GAC CTG GCT ATG CTG GCT GCG ATT CGC CGC GTT TAC GGG Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly 225 230 235 240			720
15	CTA CTT GCC AAT ACG GTG CGG TAT CTG CAG TGC GGC GGG TCG TGG CGG Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg 245 250 255			768
20	GAG GAC TGG GGA CAG CTT TCG GGG ACG GCC GTG CCG CCC CAG GGT GCC Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala 260 265 270			816
25	GAG CCC CAG AGC AAC GCG GGC CCA CGA CCC CAT ATC GGG GAC ACG TTA Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu 275 280 285			864
30	TTT ACC CTG TTT CGG GCC CCC GAG TTG CTG GCC CCC AAC GGC GAC CTG Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu 290 295 300			912
35	TAT AAC GTG TTT GCC TGG GCC TTG GAC GTC TTG GCC AAA CGC CTC CGT Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg 305 310 315 320			960
40	TCC ATG CAC GTC TTT ATC CTG GAT TAC GAC CAA TCG CCC GCC GGC TGC Ser Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys 325 330 335			1008
45	CGG GAC GCC CTG CTG CAA CTT ACC TCC GGG ATG GTC CAG ACC CAC GTC Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val 340 345 350			1056
50	ACC ACC CCC GGC TCC ATA CCG ACG ATA TGC GAC CTG GCG CGC ACG TTT Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe 355 360 365			1104
55	GCC CGG GAG ATG GGG GAG GCT AAC TGA Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn *			1131

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTATGAATTC ATATGGCTTC GTACCCCGGC

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
10 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

15

TTATTTCTAG AGGTCGAAGA TGAGGGT

27

REVENDICATIONS

- 5 1- Séquence d'acides nucléiques codant pour une thymidine kinase caractérisée en ce qu'elle possède par rapport à la séquence sauvage au moins une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP.
- 10 2. Séquence d'acides nucléiques caractérisée en ce qu'elle dérive de la séquence codant pour une thymidine kinase sauvage, ladite séquence possédant au moins une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP.
- 15 3-Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle dérive de la séquence codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1.
- 20 4-Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 3 caractérisée en ce ladite séquence comprend au moins une substitution d'une guanine en position 180 par une adénine (G180A).
- 25 5- Séquence d'acides nucléiques codant pour un variant de la thymidine kinase caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi:
 (a) la séquence SEQ ID n° 3 ou une partie de celle ci portant au moins la mutation (G180A) ou un de leur brin complémentaire,
 (b) toute séquence hybridant avec les séquences (a) et codant pour un variant de la thymidine kinase selon l'invention,
 (c) les variants de (a) et (b) résultant de la dégénérescence du code génétique.
- 30 6. Séquence d'acides nucléiques codant pour un variant d'une thymidine kinase sauvage susceptible d'être obtenue par mutagenèse, dirigée ou non, d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 5.
- 35 7. Séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle peut être d'origine humaine, animale, virale, synthétique ou semi-synthétique.

8. Variant d'une thymidine kinase sauvage susceptible d'être exprimé à partir d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. Variant d'une thymidine kinase comprenant au moins une mutation au niveau de son site de fixation à l'ATP.

5 10. Variant selon la revendication 9 caractérisé en ce que la région impliquée dans la liaison avec l'ATP et portant au moins ladite mutation est représentée par le motif GXXXXGK(T/S).

11. Variant selon la revendication 9 ou 10 caractérisé en ce que la région portant au moins ladite mutation est représentée par GPHGMGKT.

10 12. Variant selon la revendication 11 caractérisé en ce que cette mutation comprend au moins une substitution en position 60 d'une Méthionine par une Isoleucine.

13. Variant d'une thymidine kinase sauvage caractérisé en ce qu'il s'agit du mutant 1537:E4.

15

14. Variant d'une thymidine kinase selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il présente au moins l'une des performances cinétiques suivantes:

- 20 - une diminution de l'inhibition de la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside à des concentrations élevées en ganciclovir ou en analogue de nucléoside;
- une vitesse de phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside au moins doublée et/ou
- une réduction de la vitesse de phosphorylation de la thymidine d'au moins un facteur de 1,5.

25 15. Variant d'une thymidine kinase sauvage caractérisé en ce qu'il présente les propriétés cinétiques suivantes:

- 30 - une absence presque totale d'inhibition de l'activité de phosphorylation du ganciclovir contrairement à l'enzyme sauvage pour laquelle l'inhibition est très nette à partir de 15 μ M;
- une augmentation d'un facteur de 2 à 2,5 de la vitesse initiale de phosphorylation du GCV à partir de 15-20 μ M par rapport à l'enzyme sauvage et
- une vitesse initiale maximale (V_{max}) de la phosphorylation de la thymidine réduite d'un facteur 1,5 par rapport à l'enzyme sauvage.

16. Cassette d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7, un promoteur permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription.

5 17. Vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7 ou une cassette selon la revendication 16.

18. Vecteur selon la revendication 17 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

10 19. Vecteur selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus recombinant défectif.

20. Vecteur selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un rétrovirus recombinant défectif.

21. Vecteur selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un AAV recombinant défectif.

15 22. Vecteur selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un SV recombinant défectif.

23. Vecteur selon la revendication 17 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur chimique ou biochimique.

20 24. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et ou un vecteur selon l'une des revendications 18 à 23.

25. Composition pharmaceutique comprenant un variant selon l'une des revendications 8 à 15.

25 26. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 24 ou 25 pour le traitement des désordres hyperprolifératifs.

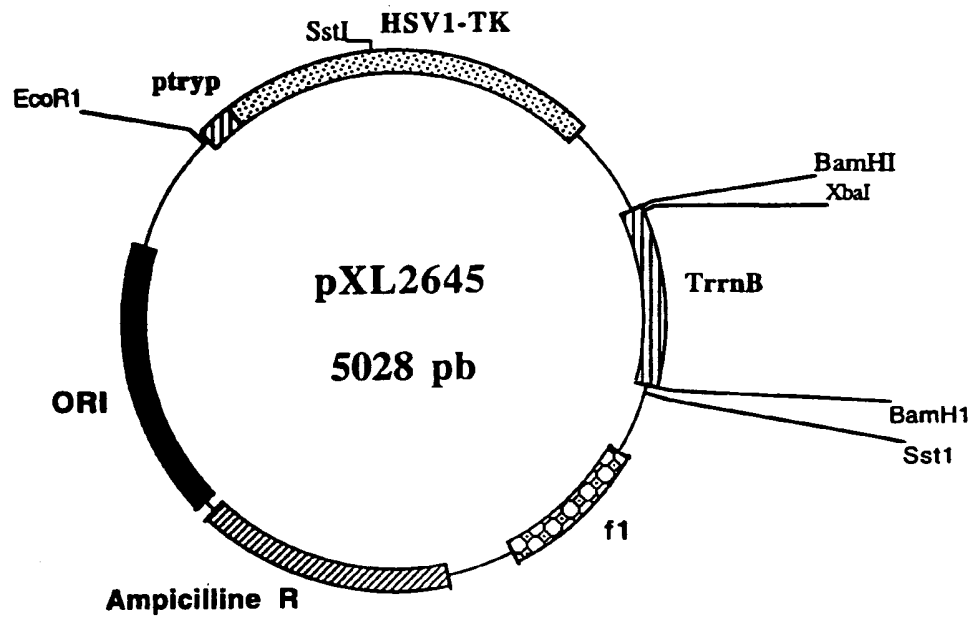


Figure 1

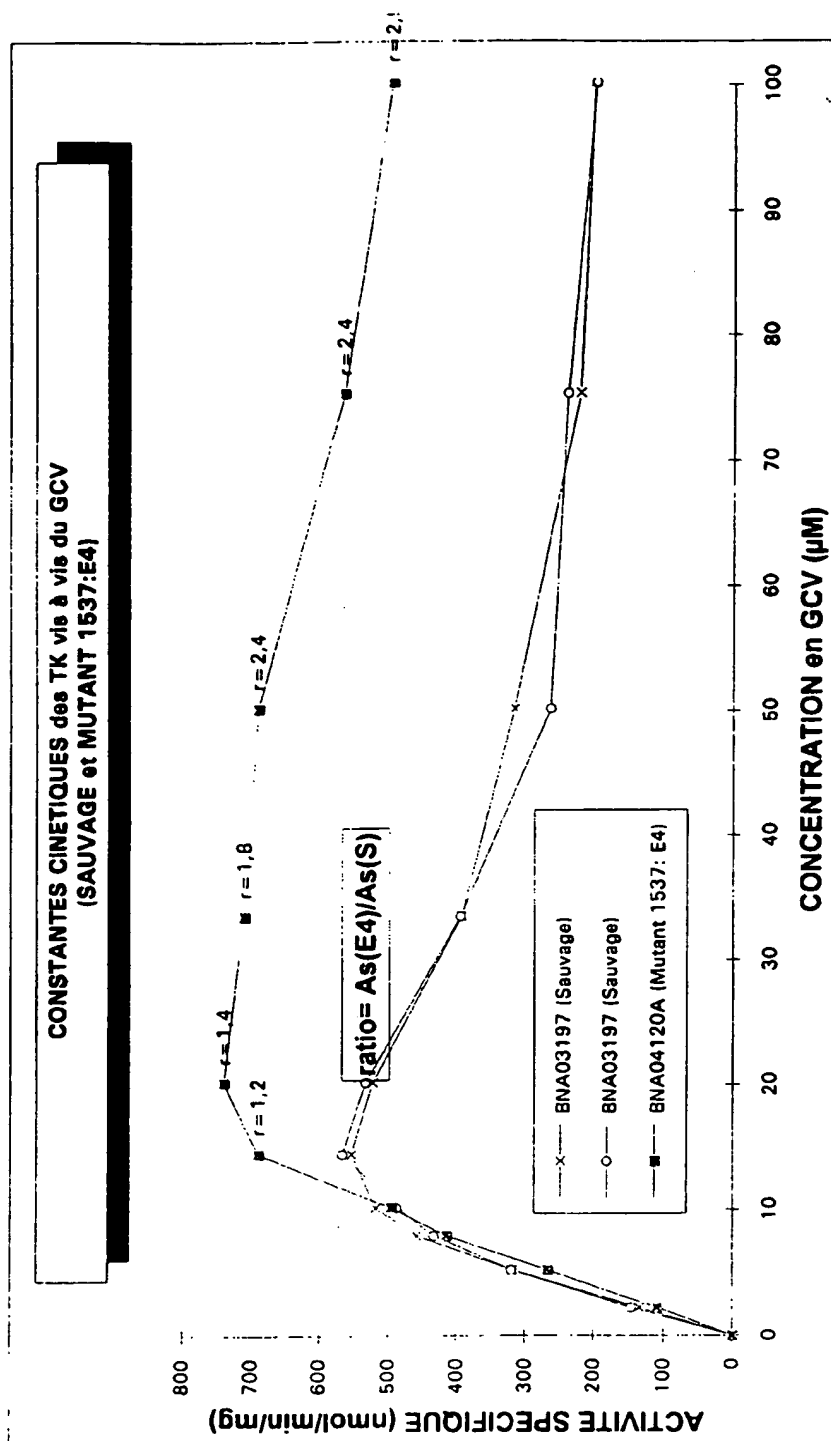


Figure 2

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2744731

N° d'enregistrement
nationalFA 526657
FR 9601603

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-95 30007 (UNIV WASHINGTON) 9 Novembre 1995 * page 9, alinéa 3; revendications 8-11, 38-46; figures 3, 15 * * page 17, alinéa 2 * ---	1-3, 5-11, 14-23
X	VIROLOGY (1988), 163(2), 638-42 CODEN: VIRLAX; ISSN: 0042-6822, XP000609212 LIU, QINGYUN ET AL: "Site-directed mutagenesis of a nucleotide-binding domain in HSV-1 thymidine kinase: effects on catalytic activity" * le document en entier * ---	1-3, 5-11, 14-23 4,12
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1992, 267, 6584-6589, XP002018163 MUNIR KM ET AL: "PERMISSIBLE AMINO-ACID SUBSTITUTIONS WITHIN THE PUTATIVE NUCLEOSIDE-BINDING SITE OF HERPES-SIMPLEX VIRUS TYPE-1 ESTABLISHED BY RANDOM SEQUENCE MUTAGENESIS" * le document en entier * -----	4,12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 9)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
11 Novembre 1996		Gurdjian, D
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un ou de plusieurs revendications ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		